

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 27 932 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁸:
G01 N 33/569
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/70

②1 Aktenzeichen: 196 27 932.1
②2 Anmeldetag: 11. 7. 96
④3 Offenlegungstag: 15. 1. 98

DE 196 27 932 A 1

⑦1 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:
Simon, Viviana, 12053 Berlin, DE; Rolfs, Arndt,
Dr.med., 18055 Rostock, DE

⑤4 Sensitiver Epstein-Barr-Virus DNA-Nachweis

⑤7 Durch Auswahl einer Sequenz des EBV-Genoms wird ein besonders sensitiver Epstein-Barr-Virus DNA-Nachweis ermöglicht. Die bereitgestellten Sonden eignen sich für die Verwendung als PCR-Primer, die Herstellung von EBV-Sonden und zum Nachweis von EBV durch Hybridisierung mit nachweisbar markierten Sonden.

DE 196 27 932 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist eine Nukleinsäuresonde zum Nachweis von Epstein-Barr-Virus Nukleinsäuren, ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von Kopien von Fragmenten des EBV-Genoms und ein Verfahren zum Nachweis von EBV.

Hintergrund der Erfindung

Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein weitverbreitetes humanpathogenes gamma-Herpesvirus. Es hat einen ausgeprägten Organotropismus: es werden B-Lymphozyten, die den Glykoproteinrezeptor CD 21 tragen, infiziert. Bereits die Virusbindung bewirkt eine Aktivierung der B-Zellen, die frühzeitig nach Auftreten der ersten viralen Antigene in den Zellen (EBNA2) und dem anschließendem Beginn der viralen und zellulären DNS-Synthese immortalisiert werden. Dabei kommt es zur Sekretion von B-Zell-Wachstumsfaktoren. Ein typischer Infektionszustand ist die Latenz mit episomal vorliegender viraler DNA. Spontan oder durch Induktionsmechanismen kann es in derartigen Zellen zu einer produktiven Infektion mit der Bildung von infektiösen Viruspartikeln kommen. EBV, als Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber), wird auch eng mit zahlreichen malignen Erkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom und verschiedenen B-Zell-Lymphomen bei Immunsupprimierten assoziiert.

Stand der Technik

Die bisher verwendeten Methoden der Herpesvirennachweise basieren auf zwei Prinzipien:

- Serologischer Nachweis vorhandener Antikörper, Voraussetzung ist ein intaktes Immunsystem.
- Direkter Virusnachweis oder Virus-DNA-Nachweis. Unter den gentechnologischen Methoden bietet sich vor allem die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, US-A-4,683,202) an. Mittlerweile wurden zahlreiche PCR-Assays für den DNA-Nachweis des Epstein-Barr-Virus beschrieben, z. B. in J. Clin. Microbiol. 28: 2187–2190, 1990; J. Clin. Microbiol. 30: 2826–2829, 1992; und Aids Res. and Hum. Retroviruses 8: 1869–1874, 1992.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Nukleinsäuresonden zum Nachweis von EBV bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist eine Nukleinsäuresonde mit einer Länge von weniger als 350 Basen und mehr als 10 Basen, welche eine oder mehrere Sequenzen von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Basen aufweist, die zu 90% oder mehr komplementär oder homolog sind zu SEQ.ID.NO. 12.

Kurze Beschreibung der Figuren

In Fig. 1A–1C ist die Sequenz der BamHI-W-Region von EBV gezeigt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Unter einer Nukleinsäuresonde wird im Sinne der Erfindung eine Sonde zum Nachweis von Nukleinsäuren verstanden. Diese Sonde bindet Nukleinsäuren durch Wechselwirkung von Basen der Sonde mit Basen der Nukleinsäure. Aus diesem Grund beruht die Bindung der Sonde mit der nachzuweisenden Nukleinsäure auf der Komplementarität einer Basensequenz der Sonde mit einer Basensequenz der Nukleinsäure. Als Nukleinsäuresonde kommen beispielsweise Nukleinsäuren in Frage. Bevorzugt ist die Verwendung von Oligonukleotiden. Als Sonde können jedoch auch basensequenzhaltige Moleküle dienen, bei denen der natürliche Zuckerphosphatbackbone durch einen künstlichen Backbone, z. B. einen peptidhaltigen Backbone, ersetzt ist. Solche Nukleinsäuresonden sind beispielsweise beschrieben in WO 92/20702 bzw. WO 92/20703. Als Backbone wird ein langer Molekülteil verstanden, an welchen die Basen kovalent gebunden sind (z. B. Zucker-Phosphat-Polymere oder Polypeptide). Die Tatsache der Hybridisierung oder/und ihre enzymatische Verlängerung kann zum Nachweis von EBV verwendet werden.

Die Länge der Nukleinsäuresonde richtet sich auch nach der geplanten Verwendung der Nukleinsäuresonde. Generell wird eine Länge von weniger als 350, jedoch mehr als 10 Nukleotiden (nt) als im Sinne der Erfindung für einsetzbar betrachtet. Wenn die Sonde als Nachweissonde eingesetzt werden soll, haben sich insbesondere Längen von zwischen 350 und 50 nt, bevorzugt zwischen 300 und 100 nt als geeignet erwiesen. Für die Verwendung als Primer sind insbesondere Oligonukleotide einer Länge von zwischen 50 und 10 nt, besonders bevorzugt zwischen 25 und 13 nt geeignet.

Diese Sonde enthält eine Sequenz, die mindestens 10 aufeinanderfolgende Nukleobasen am Backbone enthält, die zu 90% oder mehr komplementär oder homolog ist zu einer Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure. Beispielsweise ist hiermit eine Sonde umfaßt, die bei einer Länge von 10 nt 9 oder 10 streng komplementäre oder homologe (zu einer entsprechenden Sequenz von aufeinanderfolgenden Basen des EBV-Genoms) Nukleotide enthält. Die Sonde kann aber auch mehrere solche Sequenzen von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Basen aufweisen, welche durch andere Sequenzen (EBV-spezifische oder nicht EBV-spezifische) voneinander getrennt sind. Die Sonde kann also neben den EBV-spezifischen Sequenzen auch weitere Sequenzen enthalten, die nicht EBV-spezifisch sind, z. B. zur Erkennung der Sonde durch andere Moleküle, z. B. weitere Sonden. Nicht enthalten sein sollten allerdings Sequenzen, die mit Nukleinsäuren anderer Organismen, als EBV, die in der Probe vorkommen könnten, unter den gewählten Bedingungen zu einem Nachweissignal führen würden.

Unter einer Nachweissonde im Sinne der Erfindung wird eine Sonde verstanden, deren Hybridisierung mit EBV-Sequenzen zum Nachweis von EBV verwendet wird. In den meisten Fällen enthält eine Nachweissonde eine funktionelle Gruppen, die üblicherweise in den nachzuweisenden EBV Nukleinsäuren nicht vorkommt.

Unter einem Primer wird eine Sonde verstanden, die an einem ihrer Enden, bevorzugt am 3'-Ende enzymatisch, z. B. mit Hilfe einer Polymerase und Monodeoxyribonukleosidtriphosphaten, verlängert werden kann. Auch Primer können durch eine oder mehrere funktionelle Gruppen modifiziert sein.

Die erfindungsgemäße Sonde kann funktionelle Gruppen enthalten, die für die geplante Verwendung der Nukleinsäuresonden gezielt ausgewählt sind. Solche funktionellen Gruppen sind beispielsweise detektierbare oder immobilisierbare Gruppen.

Eine detektierbare Gruppe im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive (^{32}P), farbige, oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate im allgemeinen besonders gut als Substrate von Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten oder das haptenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin-, Biotin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Eine immobilisierbare Gruppe im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine, die direkt oder indirekt mit einer festen Phase verbunden werden kann. Hierzu eignen sich insbesondere Wechselwirkungen zwischen immunologisch aktiven Verbindungen, wie Antikörpern und Antigenen oder Haptenen oder von Rezeptoren und Liganden, wie z. B. Avidin oder Streptavidin und Biotin. Bevorzugt als immobilisierbare Gruppe ist ein Hapten.

Wenn im Folgenden von einer Sequenz gesprochen wird, wird davon ausgegangen, daß es eine Basensequenz ist.

Basen im Zusammenhang mit Sonden und Nukleinsäuren sind ausgewählt aus den natürlich vorkommenden, wie den häufig vorkommenden Nukleinsäurebasen A, G, C, T und U sowie selteneren Basen, wie I etc. oder künstlichen wie 7-Deaza-G.

Komplementär zueinander sind Sequenzen oder Basen aufgrund der spezifischen Basen-Basen-Wechselwirkung, z. B. der Basen A und T, G und C, A und U oder Deaza-G und C.

Homolog sind Sequenzen oder Basen, welche dieselben Bindeeigenschaften zu einer hierzu komplementären Base oder Sequenz aufweisen, z. B. A und A, Deaza-G und G oder T und U.

Die Sequenz SEQ.ID.NO. 13 entspricht den Nukleotiden 615—1030 der Sequenz aus J. Virol. 44: 286—294, 1982, Fig. 1A—1C, der Sequenz der Long Internal Repeats der BamH1W-Region des EBV-Genoms.

Als Long Internal Repeat (LIR) werden Sequenzen der BamH1W-Region bezeichnet, die in jeder BamH1W-Region vorhanden sind, bevorzugt solche, die in jeder BamH1W-Region mehrfach vorkommen. Die Sequenz der BamH1W-Region ist aus den oben genannten Publikationen bekannt (siehe auch Nature (London), 310: 207—211, 1984). Die BamH1W-Region des EBV-Genoms umfaßt eine Länge von ca. 3.071 Basen bei einer Gesamtlänge des Genoms von ca. 175 kb. Diese Region wiederholt sich bis zu 11-mal innerhalb des EBV-Genoms. Dabei handelt es sich um einen hochkonservierten Bereich, der für 2 Exons des EBNA-Proteins codiert (J. Virol. 44: 286—294, 1982). Die Sequenz eines LIR ist in Fig. 1 angegeben.

Die Länge der EBV-spezifischen Sequenz der Sonde ist bevorzugt kürzer als eine Long Internal Repeat Sequenz (LIR). Daher liegt die Sequenz bevorzugt innerhalb einer LIR. Besonders bevorzugt ist die Sequenz von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Basen zu 90% oder mehr komplementär oder homolog zu SEQ.ID.NO. 12, die den Nukleotiden 850 bis 970 der Fig. 1A—1C entsprechen.

Bedingungen, bei denen die erfindungsgemäßen Sonden an EBV-Nukleinsäuren binden können, aber nicht an Nukleinsäuren von anderen humanpathogenen Herpesviren oder an humane DNA, können von dem Fachmann auf einfache Weise ermittelt werden. Hierzu kann er Hybridisierungsversuche durchführen. Eine Vorauswahl kann beispielsweise durch Sequenzvergleich mit Datenbanken, welche die genomischen Sequenzen von anderen humanpathogenen Herpesviren und humaner DNA enthalten, erhalten werden. Bevorzugt werden die Hybridisierungsbedingungen so eingestellt, daß eine Sonde, die eine exakt komplementäre Sequenz enthält, mit der nachzuweisenden Nukleinsäure hybridisiert, nicht jedoch eine Nukleinsäure, die innerhalb des bindenden Bereiches ein oder mehrere Mismatches aufweist.

Als besonders zweckmäßig haben sich Sonden erwiesen, die eine der Sequenzen der SEQ.ID.NOS. 1 und 3 oder Teilen davon mit einer Länge von 10 oder mehr Basen enthält oder eine hierzu komplementäre Sequenz enthält. Nukleinsäuresonden mit einer längeren Sequenz sind beispielsweise durch in-vitro-Amplifikation eines Teils der BamH1W-Region des EBV-Genoms herstellbar. Unter in-vitro-Amplifikation wird eine Vermehrung eines Teils der Region verstanden, die nicht innerhalb einer lebenden Zelle stattfindet. Beispiele für in-vitro-Amplifikationen sind die Polymerase-Ketten-Reaktion (US-A-4,683,202) oder NASBA (EP-B-0 329 822). Mit Hilfe dieser Verfahren können durch Wahl der Primersequenz bestimmte Bereiche des EBV-Genoms zur Grundlage einer Amplifikation gemacht werden. Im Fall der PCR werden Sonden erhalten, die jeweils die Primersequenzen und die zwischen den 3'-Enden der Primer gelegenen Sequenz enthalten.

Erfindungsgemäße Sonden, die auch als Primer für die Herstellung längerer Sonden (z. B. der oben genannten Nachweissonden) verwendbar sind, werden zweckmäßigerweise durch chemische Synthese hergestellt. Hiertür existieren kommerziell erhältliche Synthesizer und geeignete aktivierte und geschützte Mononukleotide.

Je nach Länge eignen sich die erfindungsgemäßen Sonden als Nachweissonden (längere Sequenzen) oder als

Primer (kürzere Sequenzen). Es ist jedoch auch möglich, zwei oder mehr Sonden miteinander zu kombinieren. In einem ersten bevorzugten Fall werden zwei kürzere Sonden miteinander kombiniert, um ein Primerpaar zur Durchführung eines Amplifikationsverfahrens bereitzustellen. Hierzu werden die Sequenzen der Sonde so gewählt, daß sie zu unterschiedlichen Strängen des EBV-Genoms komplementär sind. Die Lage der Hybridisierungspositionen der Primer wird so gewählt, daß das Verlängerungsprodukt eines Primers als Templat für die Verlängerung des anderen Primers benutzt werden kann. Hierdurch wird eine theoretisch exponentielle Amplifikation von Nukleinsäuren erreicht. Sofern mehrere Bereiche (z. B. in unterschiedlichen Sequenzen des EBV-Genoms) amplifiziert werden sollen, können auch noch weitere Primerpaare in die Kombination integriert werden. Darüber hinaus hat es sich als zweckmäßig erwiesen, ein wie oben geschildert definiertes Primerpaar mit einer Nachweissonde zu kombinieren, wobei die Sequenz der Nachweissonde so gewählt wird, daß sie mit dem Amplifikationsprodukt in dem Bereich, der zwischen den Primerhybridisierungsstellen liegt, hybridisieren kann.

In den oben genannten Kombinationen ist jede erdenkliche Verpackung möglich. Besonders bevorzugt werden jedoch die Primer in einem ersten Gefäß und die Sonden in einem zweiten Gefäß verpackt.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur spezifischen Herstellung einer Vielzahl von Kopien von Fragmenten des EBV-Genoms unter Verwendung von mindestens 2 erfindungsgemäßen Sonden. Für diesen Fall empfehlen sich die oben genannten kürzeren Sonden als Primer. Das Verfahren kann analog zu dem in US-A-4,683,202 geschilderten Verfahren geführt werden.

Bevorzugt wird einer der Primer aus dem Bereich von SEQ.ID.NO. 13, besonders bevorzugt SEQ.ID.NO. 12 ausgewählt. Für den Fall, daß ein Gegenprimer erforderlich ist, kann dieser zwar ebenfalls aus diesem Bereich gewählt werden, bevorzugt wird er jedoch aus dem Bereich der Nukleotide gewählt, die den höheren Positionen entsprechen. Besonders bevorzugt hybridisieren die Gegenprimer so, daß das 3'-Ende dieser Primer rechts von Nukleotidposition 1150 liegt. Besonders bevorzugt liegt der zweite Primer zwischen Position 1180 und 1500 von Fig. 1A-1C.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von EBV wobei eine oder mehrere erfindungsgemäße Sonden an das EBV-Genom gebunden werden und das Auftreten der Bindung zum Gegenstand des Nachweises benutzt wird. Für den Fall, daß es sich bei der erfindungsgemäßen Sonde um eine Nukleinsäure handelt, dann handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform von auf einem Hybridisierungsereignis beruhenden Test. Auf Hybridisierungsereignisse beruhende Tests sind in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt. Soweit experimentelle Details im Folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, z. B. in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, Bezug genommen. Zu den bekannten Methoden gehört auch die Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie in EP-A-0 324 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die unter anderem vom Ausmaß der Komplementarität zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Sofern es sich bei der Sonde um eine PNA-Sonde handelt, wird auf die Offenbarung in WO 92/20703 verwiesen. Diese Sonden zeichnen sich insbesondere dadurch aus, daß ihre Hybridisierungsneigung weniger vom Salzgehalt der Hybridisierungslösung abhängig ist.

Die erfindungsgemäßen Nachweisverfahren bestimmen das Auftreten der Bindung zwischen der Sonde und der nachzuweisenden Nukleinsäure als Zeichen für die Anwesenheit oder die Menge an nachzuweisender EBV-Nukleinsäure. Dies kann beispielsweise geschehen, in dem eine Probe, in der EBV vermutet wird, auf eine Membran aufgebracht und die Nukleinsäuren an der Membran immobilisiert werden. Anschließend wird eine Lösung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonde aufgebracht und unter Bedingungen, bei denen eine Bindung der Sonde an der nachzuweisenden Nukleinsäure stattfindet, inkubiert. Die Menge bzw. das Auftreten einer markierten Gruppe, welche an die Sonde gebunden ist, auf der Membran zeigt die Anwesenheit von EBV-Nukleinsäuren an.

In einem besonderen Verfahren werden Primerpaare eingesetzt, die so charakterisiert sind, daß ein erstes Primerpaar ein Amplifikationsprodukt erzeugt, welches wiederum als Templat für die Herstellung eines kürzeren Amplifikates unter Verwendung des zweiten Primerpaares verwendet wird. Ein solches Vorgehen ist auch als nested PCR bekannt geworden. Bevorzugte Kombinationen von Primern sind daher SEQ.ID.NO. 1/SEQ.ID.NO. 2 und SEQ.ID.NO. 3/SEQ.ID.NO. 4.

Mit der oben genannten Kombination von 4 Primern ist es auch möglich, eine große Menge von EBV-spezifischen Sonden herzustellen. Nach getrennter Amplifikation mit beiden Primerpaaren wird das entstandene kürzere Amplifikat als Sonde eingesetzt. Das heißt, diese Sonde wird zur Hybridisierung mit EBV-Nukleinsäuren oder Amplifikaten einer zu untersuchenden Probe gebracht und die entstandenen Hybride nachgewiesen.

Die genannten Primerpaare zeichnen sich dadurch aus, daß sie ein ähnliches Schmelzverhalten in der PCR haben. Darüber hinaus neigen die Primerpaare praktisch nicht zur Primer-Dimerbildung. Überraschenderweise können mit den erfindungsgemäßen Sonden besonders viele EBV Isolate nachgewiesen werden. Die Sonden führen zu einem besonders sensitiven Nachweis.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher:

Beispiel 1

Leukozytenpräparation aus einer Blutprobe (Erylysis)

Zu 10 ml EDTA-antikoaguliertem peripheren Blut werden 20 ml Erylysispuffer hinzugefügt, gut durchmischt und 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 500 g und 4°C wird der hämolysierte Überstand verworfen. Das Leukozytenpellet wird in 1 × PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Dekantieren des Überstandes kann das Sediment entweder bei -20°C aufbewahrt oder weiterverarbeitet werden.

Liquor cerebrospinalis und andere Körperflüssigkeiten

0,5 bis 2 ml Liquor cerebrospinalis werden in 1,5 ml Reagenzgefäßen schonend bei 350 g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und getrennt vom Sediment bei -20°C gelagert. Intraoperativ gewonnene Proben, wie Glaskörperpunktat, Augenkammerpunktat oder Augenspülflüssigkeit, werden wie Liquor behandelt. Sediment und Überstand werden getrennt bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Alkalische Lyse

Das Leukozytenpellet wird mit 50 µl, die Sedimente von allen anderen Körperflüssigkeiten mit 25 µl 50 mM NaOH überschichtet, gut durchmischt und kurz zentrifugiert. Die Proben werden mit 100 µl Paraffinöl überschichtet und 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt. Zum Neutralisieren werden für je 25 µl 50 mM NaOH je 4 µl 1 M Tris HCl (pH 7.4) durch die Ölschicht durchpipettiert. Das neutralisierte Lysat kann direkt in die PCR eingesetzt werden (Rolfs A., Schuller L., Finckh U., Weber-Rolfs L. 1992. PCR: Clinical Diagnostics and Research. New York, Berlin, Springer Verlag, 1992).

Durchführung der PCR

Die Reagenzien für die PCR werden auf Eis in 0,5 µl Reagenzgefäß pipettiert. Die Reagenzgefäße werden direkt auf dem Eis in den auf 95°C vorgeheizten Thermocycler gesetzt (Hot-Start-PCR). Die Lage-Angaben für die Sonden beziehen sich auf die Numerierungen aus J. Virol. 44: 286 - 294 (1982), Fig. 1.

Tabelle

PCR-Pipettierschema (25 µl Ansatz) für die diagnostische EBV-PCR

Reagenzien	Pipettierschema A	Endkonzentration
Aqua bidest	17,3 µl	
PCR Puffer (10x)	2,5 µl	10 mM Tris HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	200 µM
Primerpaar 1407/08 (10 µM) (SEQ.ID.NO. 1/2)	2 µl	0,8 µM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
DNA-Probe	2,5 µl	

Primer 1407/1408 (Lage: " + "-Primer 878-898, " - "-Primer 1170-1189)
Amplifikatlänge 310 bp.

+ Primer 5' gtc ccc acg cgc gca taa tg (SEQ.ID.NO. 1)

- Primer 5' gtg gac tcc tgg cgc tct ga (SEQ.ID.NO. 2)

Temperaturprofil

1. Initiale Denaturierung 5' 95° C
2. Denaturierung 45" 95° C
3. Annealing 90" 68° C
4. Elongation 45" 72° C
5. Terminale Elongation 5' 72° C
6. Abkühlung 4° C

Die Schritte 2. bis 4. werden 35 × wiederholt.

PCR mit inneren Primern

Ziel der PCR mit inneren Oligonukleotidprimerpaar 1409/10 ist die Herstellung ausreichender DNA-Mengen für eine Dig-Markierungsreaktion zur Herstellung spezifischer Sonden.

Tabelle

PCR-Pipettierschema (25 µl Ansatz) für die Herstellung eines inneren Amplifikates

Reagenzien	Pipettierschema B	Endkonzentration
Aqua bidest	17,8 µl	
PCR Puffer (10x)	2,5 µl	10 mM Tris HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	200 µM
Primerpaar 1409/10 (10 µM) (SEQ.ID.NO. 3/4)	2 µl	0,8 µM
Taq (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
DNA der Positivkontrolle	2 µl	

Primer 1409/1410 (Lage: " + "-Primer 933—952, " — "-Primer 1082—1101)

Amplifikatlänge 167 bp.

+ Primer: 5' cta tgg ttg gct gcg ctg ct (SEQ.ID.NO. 3)

— Primer: 5' ttg gct gct gtc tgg ctt ac (SEQ.ID.NO. 4)

Verwendetes Temperaturprofil für die innere PCR

1. Initiale Denaturierung 5' 95° C
2. Denaturierung 45" 95° C
3. Annealing 90" 68° C
4. Elongation 45" 72° C
5. Terminale Elongation 5' 72° C
6. Abkühlung 4° C

Die Schritte 2. bis 4. werden 35 × wiederholt.

Reamplifikation und Digoxigenin Markierungsreaktion

Die Herstellung der doppelsträngigen Hybridisierungssonden besteht aus zwei aufeinander basierenden PCR-Reaktionen, d. h. die Amplifikate aus der ersten (PCR mit inneren Primern) werden, nach einer Agarosegel-Reinigung, als Matrix in der zweiten, der Markierungs-PCR, eingesetzt.

Tabelle

PCR-Pipettierschemata. Schema C (50 µl Ansatz) wird bei einer Reamplifikations-PCR und Schema D (50 µl Ansatz) bei einer Markierungs-PCR verwendet

Reagenzien	Pipettierschema C	Pipettierschema D	Endkonzentration
Aqua bidest	37,45 µl	35,7	
PCR Puffer (10x)	5 µl	5 µl	10 mM Tris HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂
dNTPs (10 mM)	0,25 µl		50 µM
dNTP labelling Mix (10 x)		2 µl	50 µM
Primerpaar 1409/10 (10 µM) (SEQ.ID.NO. 3/4)	4 µl	4 µl	0,8 µM
Taq DNA Polymerase(5 U/µl)	0,3 µl	0,3 µl	1,5 U
DNA Probe	3 µl	3 µl	

Das verwendete Temperaturprofil ist identisch mit dem für die PCR mit den inneren Primern, nur die Anzahl der Zyklen wurde auf 45 erhöht.

Darstellung der PCR-Produkte aus Agarosegel

Ein 3%iges Agarosegemisch, bestehend aus 2 Teilen Biorad Agarose (0,45 g) und einem Teil NuSieve GTG Agarose (0,15 g), wird mit 22 ml 1 × Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) aufgekocht, mit 0,5 µl (1 µg/µl) Ethidiumbromid vorgefärbt und bei 4°C zu einem ca. 3 mm dicken Gel gegossen.

6 µl eines jeden PCR-Ansatzes werden in einer Microtiterplatte mit 1 µl 10 × Gelladepuffer gut vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Im ersten und letzten Slot einer jeden Reihe wird zur Beurteilung der Länge der Amplifikate 1 µl des Boehringer DNA-Längen-Standard VI (Boehringer Mannheim GmbH, BRD) aufgetragen.

Die Gelelektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 100 Volt und einer Stromstärke von 50 mA über die Dauer von 30 Minuten. Zur Auswertung wird das Gel auf einen 302 nm UV-Transilluminator gelegt und mit einer Polaroidkamera (Blende: 4,5, Belichtungsdauer: 2 Sekunden) fotografiert.

Herstellung von DNA-Matrix mittels eines präparativen Agarosegels

Aus 1,4 g Nusieve GTG und 20 ml 1 × Tris-Acetat-Puffer wird ein 1,5% niedrigschmelzendes Agarosegel hergestellt. Nach dem Erhitzen wird der homogenen Masse 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. 100 µl der Produkte der inneren PCR (Primerpaar 1409/10, SEQ.ID.NO. 3/4) werden mit 10 µl 10 × Gelladepuffer gut vermischt und in eine große Geltasche pipettiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird mit einem 302 nm UV-Transilluminator die Zielbande aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reagenzgefäß überführt. Das Gelstück wird in einem Thermoblock aufgeschmolzen und jeweils 3 µl in 0,5 µl Reagenzgefäßen für die spätere Markierungsreaktion aliquotiert.

Nachweis der Markierungsreaktion im Agarosegel

In einem 3% Agarosegel werden jeweils nach dem Mischen mit 10 × Gelladepuffer, 5 µl der markierten Amplifikate neben 5 µl nicht-markierten Amplifikate aufgetragen. Die markierten Amplifikate weisen im Vergleich zu dem nicht-markierten Amplifikat ein retardiertes Laufverhalten im Gel auf und ermöglichen damit einen Rückschluß auf die erfolgte Markierungsreaktion.

Sensitivität der hergestellten Sonden

Um die Unterschiede zwischen verschiedenen Markierungsreaktionen erfassen zu können, wird die Qualität der neu hergestellten Sonde in zwei Verdünnungsreihen geprüft. In der ersten Verdünnungsreihe wird die Sonde

in dezimalen Schritten verdünnt in ein Gel aufgetragen, geblottet und, da die Sonde selbst Digoxigenin-markiert ist, direkt detektiert. Bei der zweiten Verdünnungsreihe wird das Zielamplifikat dezimal (1 µl, 0,1 µl, 0,01 µl, 0,001 µl) im Gel aufgetragen, geblottet und mit 2 µl der neu synthetisierten Sonde unter den Standardbedingungen hybridisiert und detektiert.

5

Southern Blot

Materialien

- 10 — "DIG DNA Labelling and Detection Kit non-radioactive": Boehringer Mannheim, # 1093 657.
- Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl [88 g/l]; 0,5 M NaOH [20 g/l]
- Neutralisierungspuffer: 1 M TrisHCl [121 g/l]; 2 M NaCl [117 g/l]; pH 5,0
- Nylonmembran, positiv geladene, 0,45 µ, Fa. Boehringer, # 1417 240
- Waschpuffer 1: 2 × SSC, 0,1% SDS
- 15 — Waschpuffer 2: 0,1 × SSC, 0,1% SDS
- Hybridisierungspuffer: 5 × SSC; 2,0% Blocking Reagenz, 0,1% N-Laurosylsarkosin, Na-salt (Sigma); 0,02% SDS (n-Dodecylsulfat-Natriumsalz)
- Boehringer Positivsonde: BamHI linearisierte pBr328 DNA, random priming markiert mit Digoxigenin; Boehringer, # 1062 590
- 20 — 50 ml Falcon-Röhrchen

DNA-Transfer

25 Um die im Agarosegel doppelsträngig vorliegenden Amplifikate in einzelsträngige DNA zu trennen, wird das Gel 10 Minuten lang in der Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) inkubiert und 10 Minuten in Neutralisierungspuffer (1 M Tris, 2 M NaCl, pH 5,0) gelegt.

Das neutralisierte Gel wird mit der Slotreihe nach unten auf ein vorab befeuchtetes Whatman-Papier gelegt. Anschließend wird die auf 6,8 × 10,3 cm zurechtgeschnittene Nylonmembran ohne Luftblasen auf das Gel platziert.

30 Drei ebenfalls in Neutralisierungspuffer angefeuchtete Lagen Whatman-3MM-Papier werden nacheinander über die Nylonmembran gelegt. Abschließend werden noch 5 cm Papierhandtücher darübergeschichtet und mit 500 g Gewicht beschwert. Nach 6 Stunden hat der DNA-Transfer bei Amplifikation bis 400 bp stattgefunden. Die so transferierten DNA-Amplifikate werden auf der noch feuchten Membran mit 120 mJ UV-gecrosslinkt. Die Membran wird an der Luft getrocknet und dann staubfrei bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

35

Hybridisierung mit spezifischen Proben

Die Nylonmembran wird mit 5 ml Hybridisierungspuffer bei 62°C unter Rotation für 30 Minuten vorhybridisiert. Jeweils 2 µl der Digoxigenin-markierten Sonden und der Boehringer Positivsonde (BamHI-linearisierte 40 pBr328 DNA, random priming markiert mit Digoxigenin) werden, zusammen mit Hybridisierungspuffer, thermisch denaturiert und dem Vorhybridisierungs-Mix hinzugefügt. Nach 12 Stunden wird die Lösung verworfen und die Membran zweimal bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit Waschpuffer 1 und zweimal mit Waschpuffer 2 bei 65°C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Blot-Membranen werden sofort chromogen detektiert.

45

Chromogen-Detektion der DNA-DNA-Hybride (nicht-radioaktive Detektion)

Materialien

- 50 — Detektions-Puffer 1: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,3% (w/v) TweenTM 20, pH 7,0 bei 20°C.
- Detektions-Puffer 2: 1,0% Blocking Reagenz gelöst in Detektions-Puffer 1.
- Detektions-Puffer 3: 100 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5 bei 20°.
- Detektions-Puffer 4: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 bei 20°
- Alkalische Phosphatase konjugierter polyklonaler Schaf-anti-Digoxigenin-Antikörper; Fab-Fragment, 750 U/ml, Boehringer, # 1093 328
- 55 — Farblösung für chromogen-Detektion (frisch zubereitet): 45 µl Nitroblue-Tetrazolium-Salz(NBT)-Lösung; 35 µl 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat (X-Phosphat) in 10 ml Detektions-Puffer 3.

Durchführung

60 Die Membran wird für 30 Sekunden in Detektionspuffer 1 inkubiert, gefolgt von 30 Minuten in 20 ml Detektionspuffer 2. 2 µl Antikörper-Konjugat werden mit 10 ml frisch angesetzttem Detektionspuffer 2 gemischt und dann zu der Membran hinzugegeben. Nach 30 Minuten ständigem leichtem Schütteln wird die Antikörperlösung verworfen und zweimal für 10 Minuten mit Detektionspuffer 1 gewaschen. Während der kurzen (30 Sekunden) Äquilibration mit Detektionspuffer 3, wird die Farblösung (45 µl NBT und 35 µl X-Phosphat in 10 ml Detektionspuffer 3 verdünnt) frisch hergestellt. Zur Entwicklung werden die Membranen in eine Klarsichtfolie gelegt, mit der Farblösung beschichtet und unter Ausschluß von Licht aufbewahrt. Während der Entwicklung, die bei diagnostischen Fragestellungen mindestens 2 Stunden bis maximal 24 Stunden dauert, dürfen die Membranen nicht bewegt werden. Bei Erreichen der gewünschten Anfärbung wird die Reaktion mit 3 ml Detektionspuffer 4

abgestoppt.

Resultate

Sensitivität und Spezifität

5

Dezimale Verdünnungsreihen der EBV-Kontroll-DNA (B95-8 Strain) zeigen, daß nach der Amplifikation mit dem Primerpaar 1407/08 (SEQ.ID.NO. 1/2), gefolgt von der Hybridisierung und Detektion, zuverlässig ca. 2 bis 20 EBV-Kopien nachweisbar waren. Weder DNA von anderen humanpathogenen Herpesviren noch humane DNA wurde mit den Primerpaaren 1407/08, 1409/10 amplifiziert. Die experimentell nachgewiesenen Sensitivitäten waren im direkten Vergleich mit publizierten EBV-DNA-PCR-Systemen stets mindestens 1 Zehnerpotenz sensitiver. Aufgrund der hohen Sensitivität eignet sich dieses Primersystem sowohl für die virologische Diagnostik bei akuten Erkrankungen wie auch für das Monitoring und Screening bei gefährdeten Patientenkollektiven wie Transplantationsempfängern und Immundefizienten.

10

Beispiel 2

Weitere Primerpaare

15

(+)-Primer	SEQ.ID.NO.	(-)-Primer	SEQ.ID.NO.
GGTCTATGGTTGGCTGCGCT	5	AGCGACGGTGATGAAGGTGG	6
GGTCTATGGTTGGCTGCGCT	5	TTGTGTGGACTCCTGGCGCT	7
CTATGGTTGGCTGCGCTGCT	8	TTGTGTGGACTCCTGGCGCT	7
CTATGGTTGGCTGCGCTGCT	8	TGGACTCCTGGCGCTCTGAT	9
GGCTGCGCTGCTGCTATCTT	10	GAAGTGACAATTGGCTGCTG	11

20

25

30

35

40

45

50

55

Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Strasse 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 68298
- (G) TELEFON: 0621/759-4348
- (H) TELEFAX: 0621/759-4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Sensitiver Epstein-Barr-Virus
DNA-Nachweis

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTCCCCACGC GGCATAATG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTGGACTCCT GGCGCTCTGA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

10

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CTATGGTTGG CTGCGCTGCT

20

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

30

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TTGGCTGCTG TCTGGCTTAC

20

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

50

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

55

GGTCTATGGT TGGCTGCGCT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

60

65

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGCGACGGTG ATGAAGGTGG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TTGTGTGGAC TCCTGGCGCT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTATGGTTGG CTGCGCTGCT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid" 5
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9: 10
- TGGACTCCTG GCGCTCTGAT 20
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10: 15
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 20
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid" 25
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10: 30
- GGCTGCGCTG CTGCTATCTT 20
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11: 35
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 40
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodesoxyribonukleotid" 45
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11: 50
- GAACTGACAA TTGGCTGCTG 20
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12: 55
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 121 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear 60
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

AAACTTTAGA GGCGAATGGG CGCCATTTTG TCCCCACGCG CGCATAATGG CGGACCTAGG 60
CCTAAAACCC CCAGGAAGCG GGTCTATGGT TGGCTGCGCT GCTGCTATCT TTAGAGGGGA 120
G 121

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 416 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GAGGGTGAGG CCCAGCCCCC TCCCGCCCCC GTCCACTGCC CCGGTCCCCC CAGAAGCCCC 60
CAAAAGTAGA GGCTCAGGCC ATGCGCGCCC TGTCACCAGG CCTGCCAAAG AGCCAGATCT 120
AAGGCCGGGA GAGGCAGCCC CAAAGCGGGT GCAGTAACAG GTAATCTCTG GTAGTGATTT 180
GGACCCGAAA TCTGACACTT TAGAGCTCTG GAGGACTTTA AAACCTCTAA AATCAAACT 240
TTAGAGGCGA ATGGGCGCCA TTTTGTCCCC ACGCGCGCAT AATGGCGGAC CTAGGCCTAA 300
AACCCCCAGG AAGCGGGTCT ATGGTTGGCT GCGCTGCTGC TATCTTTAGA GGGGAAAAGA 360
GGAATAAGCC CCCAGACAGG GGAGTGGGCT TGTTTGTGAC TTCACCAAAG GTCAGG 416

Patentansprüche

1. Nukleinsäuresonde mit einer Länge von weniger als 350 Basen und mehr als 10 Basen, welche eine oder mehrere Sequenzen von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Basen aufweist, die zu 90% oder mehr komplementär oder homolog sind zu SEQ.ID.NO. 13.
2. Sonde gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie unter Bedingungen, bei denen sie an EBV-Nukleinsäuren binden kann, weder an Nukleinsäuren von anderen humanpathogenen Herpesviren noch an humane DNA bindet.
3. Sonde gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine der Sequenzen der SEQ.ID.NOS. 1 bis 4 oder Teilen davon mit einer Länge von 10 oder mehr Basen oder eine der hierzu komplementären Sequenzen enthält.
4. Nukleinsäuresonde, hergestellt durch in-vitro-Amplifikation eines Teils der BamHIW-Region des EBV-Genoms.
5. Sonde gemäß Anspruch 4, enthaltend mindestens eine der Sequenzen der SEQ.ID.NOS. 1 bis 4 oder Teilen davon mit einer Länge von 10 oder mehr Basen und mindestens einer zu einer Sequenz der SEQ.ID.NOS. 1 bis 4 oder Teilen davon mit einer Länge von 10 oder mehr Basen komplementären Sequenz.
6. Sonde gemäß Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie unter Bedingungen, bei denen sie an EBV-Nukleinsäuren binden kann, weder an Nukleinsäuren von anderen humanpathogenen Herpesviren noch an humane DNA bindet.
7. Sonde gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Länge von mehr als 100 Basen hat.
8. Sonde gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Länge von weniger als 50 Basen hat.
9. Kombination enthaltend 2 oder mehr Sonden gemäß einem der vorangehenden Ansprüche.
10. Verfahren zur spezifischen Herstellung einer Vielzahl von Kopien von Fragmenten des EBV-Genoms

unter Verwendung von mindestens 2 Sonden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 8.

11. Verfahren zum Nachweis von EBV, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehr Sonden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 an das EBV-Genom gebunden werden und das Auftreten der Bindung zum Gegenstand des Nachweises benutzt wird.

12. Kombination gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleobasen am 3'-Ende der Sonden nicht zueinander komplementär sind. 5

13. Kombination gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden einen ähnlichen GC-Gehalt haben.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG 1A *

10 20 30 40
 gatccccccacggcccttctctctgtcccccctgctccctcccaacctt 49
 cgctccaccctagaccccagcttcttgacctccccgggtccaccaggcca 98
 gccggagggagccccggcagccccggcgagtcgacctccctctcccctgg 147
 cctctccttcccgcctcccacccgagccccctcagcttgacctccccacc 196
 ggggtccatcaggccggcggagggacccccggcggcccggtgtcagtcce 245
 250 260 270 280 290
 ccctgcagccgcccagtcctctgcctccaggcaogggcgccagcttttct 294
 cccccagcctgaggcccagtcctctgtgcactgtctgttaagtcacgc 343
 cteccacgcccgtccacggctcccgggcccagcctcgtccacccctccc 392
 cacggtggacaggccctctgtccacccgggccatccccgccccctgtg 441
 tccaccccagtcctcgccaggggggactttatgtgaccttgggcctgg 490
 500 510 520 530
 ctccccatagactcccatgtaagcctgcctcgagtaggtgcctccagag 539
 ccccttttgccccctggcggcccagccccgagcccgggcgcccccaaa 588
 ctttgctccagatgtccaggggtccccgaggggtgaggcccagccccctcc 637
 cgccccctgtccactgccccgggtccccccagaagcccccaaaagtagagg 686
 ctcaggccatgcgcgcccctgtcaccaggcctgccaaagagccagatcta 735
 740 750 760 770 780
 aggcggggagaggcagccccaaagcgggtgcagtaacaggtaatctctg 784
 gtagtgatttggaaccgaaatctgacacttttagagctctggaggacttt 833
 aaaactctaaaaatcaaaacttttagaggcgaatgggcgccattttgtcc 882
 ccacgcgcgcataatggcggacctaggcctaaaacccccagggaagcggg 931
 tctatggttggtgcgctgctgtctatcttttagaggggaaaagaggaata 980
 990 1000 1010 1020
 agccccagacagggggagtgggcttgtttgtgacttcaccaaaggctcag 1029
 ggccccagggggttcgcgttgctagggccaccttctcagtcacagcgctt 1078
 tacgtaagccagacagcagccaatgtcagttctagggagggggaccac 1127
 tgccccctgggtataaagtggctcctgcagctatttctggctgcacacagagc 1176
 gccaggaggtccacacaaatgtaagaggggggtcttctacctctccctagc 1225
 1230 1240 1250 1260 1270

FIG : B .

cctccgccccctccaaggactcgggcccagttttctaacTTTTcccccttc 1274
 cctccctcgtctttgccctgcgcccggggccaccttcacacccgTCgctg 1323
 actccgccatccaagcctaggggagaccgaagtgaaggccctggaccac 1372
 cccggccccgggccccccgggtatcggggccagaggtaagtggacttttaatt 1421
 ttttctgctaagcccaacactccaccacacccaggcacacactacacac 1470
 1480 1490 1500 1510

acccaccgcgtctcagggtccccctcggacagctcctaagaaggcaccgggt 1519
 cggccagtcctaccagagggggccaaagaacccagacgagtcgcgtagaag 1568
 ggtccctcgtccagcaagaagaggaggtggtaagcggttcaccttcagggt 1617
 gtaagtaacctgacctctccagggtcacataaaggaggccttagtata 1666
 catgcttctttgctttttcacagggaacctgggggctagtcgggtgggatt 1715
 1720 1730 1740 1750 1760

aggetgcctcaagttgcateagccagggttcacatgcccctcctcagttcc 1764
 ctagtccccggggttcaggccccctcgcgtccccgctcctccagagaccgc 1813
 ggcttcaggccctgcctctcctgtttacccttttagaaccacagcctgga 1862
 cacatgtgccagacgccttggtctetaaggccccctcgggtccccctggac 1911
 cccggcctcagcaaacctgctgctccccctcctgccaccccagcctcccc 1960

1970 1980 1990 2000

cctccccgcgtcccccttcgctcctgatectcccccggtccccagtaggg 2009
 ccgcctgccccctgcacccagtaacctgccccctttggccacgcacccc 2058
 gggccaggccaccttagaccggccaaagccccatccctgaagacccagc 2107
 ggccattctctcttggtaacgagcagagaagaagtagaggcccgcgggcca 2156
 ttggggccagattgagagaccagtcacaggggggcccgagggtggagccagc 2205
 2210 2220 2230 2240 2250

gggcaccgcaggtcccagcaccgcgggtccctccggggggcagagacaggc 2254
 agggccccccggcagctggccccgaggaggcgcccgagtggggcccgt 2303
 cggctgggctggccgagccccgggtctgggaggtctggggtggcgagcct 2352
 gctgtctcaggaggggacctggctccgcgggtggccctggggtaagtct 2401
 gggaggcagaggggtcgccctaggccccggggaagtggagggggagtcgcc 2450
 2460 2470 2480 2490

gggctctctgttggcagagtccgggagatcctctgagaccctccggggccc 2499
 ggactgtcgcctcagccccccagacagaccccgaggctccaggcagg 2548
 gtccggcatcttcaggggcagcaggctcaccaccacaggccccccagac 2597
 ccgggtctcggccagccgagccgaccggccccgcgcttggcgcctctctg 2646
 gggccagccgcccggggttggttctgccccctctctctgtccttcagagga 2695

FIG 1C

2700

2710

2720

2730

2740

accagggaccctcgggcaccaccagagccctcgggcccgccctccaggcgc 2744
 cctccagggtctccgctccccctctgagcccggttaaacccaaagaatgtc 2793
 tgaggggagccaccctcggggcccaggccccagagtccagagggtcaggg 2842
 gcaccctcagggtgcctccccgggtcccaggccagccggagggaaccccg 2891
 cagcccgggcggccccagaggccggttctcgcccccttccccgggcttc 2940

2950

2960

2970

2980

agagcccaggatgtccccagaaaggaccctaggcggtccctctctctcc 2989
 cctccaggcccgagcctctccctcgaggagaggggcctctttgggccct 3038
 caagtccagccccaccgagacccgagtgggcccg 3071